

编码: 10384

分类号____密级____

学号: 24520071152579

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

RNA 干扰抑制 HepG₂ 细胞 Pokemon 基因表达的
研究及 GST-Pokemon 融合蛋白的纯化

Suppressed expression of Pokemon gene in HepG₂ cells by
RNAi and purification of GST polypeptide fusion protein

张志平

指导教师姓名: 任建林 教授

专 业 名 称: 内 科 学

论文提交日期: 2010 年 5 月

论文答辩日期: 2010 年 5 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 5 月

RNA 干扰抑制 HepG₂ 细胞 Pokemon 基因表达的研究及 GST-Pokemon 融合蛋白的纯化

张志平

指导教师

任建林

教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

Pokemon是POK(POZ and Kruppel)家族成员之一, 在淋巴瘤、乳腺癌及非小细胞肺癌中均有很高的表达。Pokemon不仅与胚胎发育和细胞分化有关, 而且作为被证实的ARF特异性转录阻遏物, 它在细胞恶性转化过程中起着关键作用, 与肿瘤发生发展密切相关。已有研究证明Pokemon作用于许多肿瘤抑制基因和原癌基因的上游, 通过控制其他癌基因活性的独特作用从而成为致癌分子通路的主要开关。因此, Pokemon基因可能成为癌症新药物治疗的一个高效的靶标。

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)是世界第五大常见恶性肿瘤, 其死亡率在消化系恶性肿瘤中列第三位。既往的研究发现, HCC组织中Pokemon mRNA及蛋白的表达均高于癌旁组织及正常组织, 但是迄今为止关于Pokemon基因在HCC形成过程中的作用及其机制的报道较少。因此, 在本论文的研究中, 我们首先应用RT-PCR及免疫组化IHC检测Pokemon在肝细胞癌中的表达情况, 接着构建Pokemon siRNA真核表达载体psiRNA并筛选其稳转细胞株, 并进一步应用CCK-8及Transwell小室实验分析si-Pokemon稳转细胞株增殖及侵袭能力的变化, 由此考察Pokemon在肿瘤细胞增殖侵袭中的生物学作用。此外, 我们还成功构建了Pokemon原核表达载体, 并纯化出GST融合蛋白。

通过上述研究, 我们明确了Pokemon在肝细胞癌中高水平表达且主要定位于细胞质中, 而Pokemon基因沉默能够明显抑制HepG₂细胞的生长活性及侵袭能力, 因此我们推测原癌基因Pokemon具有促进肝癌细胞增殖及侵袭的生物学功能, 其在原发性肝癌中的高表达与肝癌的发生、发展密切相关。由此, 本课题不仅明确Pokemon在肿瘤发生发展过程中的作用, 为以Pokemon为新靶点的肿瘤基因治疗提供初步依据, 并且优化了GST-Pokemon融合蛋白表达纯化条件, 为后期通过GST pull down实验寻找Pokemon结合蛋白并进一步探讨Pokemon参与调控肿瘤细胞增殖侵袭的分子机制奠定了基础。

关键词: Pokemon; RNA 干扰; 谷胱甘肽巯基转移酶

Abstract

Pokemon is a member of the POK (POZ and Kruppel) family of transcriptional repressors. Pokemon is overexpressed in lymphoma, breast cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC). Pokemon, a central regulation gene of the important tumor suppressor ARF gene, plays an important role in cellular differentiation and embryonic development. Pokemon has been recently proven to be located upstream of many oncogenes and antioncogenes and to play a vital role in tumorigenesis. Pokemon may offer an effective new target for cancer therapy.

Human hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common tumor and third cause of cancer death in worldwide. Previous studies have shown that the expression of Pokemon protein in HCC tissues was significantly higher than in adjacent and normal tissues, however its correlation with HCC research is still quite limited. We were aimed to inhibit the expression of Pokemon in HepG₂ cells using RNA interference and analyzed the function of Pokemon on cell proliferation and invasion. Moreover, we purified the GST-Pokemon fusion protein.

We found that Pokemon protein was highly expressed in HCC and mainly localized at the cytoplasm. Silencing of the Pokemon gene significantly inhibited the cell growth and invasive activity on HepG₂ cells stably transfected with psiRNA. Therefore, our results indicated that pokemon promote hepatoma cells proliferation and invasion. The high expression of Pokemon in HCC may play important roles in carcinogenesis and progression of HCC. Pokemon might be a potent target for the new therapeutic target for HCC. Further studies need to be urged to define the exact role and mechanism of Pokemon during HCC development and therefore, we purified the GST-Pokemon fusion protein for GST pull down assay, aim to explore Pokemon interacting binding protein and address these issues in the further study.

Keywords: Pokemon; siRNA; GST

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
目 录	III
TABLE OF CONTENTS	V
第一章 前 言	1
1.1 Pokemon	1
1.1.1 Pokemon 的发现与生物学特征	1
1.1.2 Pokemon 的亚细胞定位及组织分布	2
1.1.3 Pokemon 与肿瘤发生的关系	3
1.2 肝细胞癌分子机制研究	7
1.3 RNA 干扰	9
1.4 GST 作用多肽融合蛋白的纯化	10
1.5 实验设计	10
第二章 材料及方法	11
2.1 RNA 干扰抑制 HepG ₂ 细胞 Pokemon 基因表达的研究	11
2.1.1 材料	11
2.1.2 方法	16
2.2 GST 多肽融合蛋白的纯化	27
2.2.1 材料	27
2.2.2 方法	29
第三章 结果与分析	39

3.1 RNA 干扰抑制 HepG₂ 细胞 Pokemon 基因表达的研究	39
3.1.1 结果.....	39
3.1.2 小结.....	44
3.2 GST 多肽融合蛋白的纯化	45
3.2.1 结果.....	45
3.2.2 小结.....	51
第四章 讨论与展望	52
4.1 Pokemon 与原发性肝癌.....	52
4.2 RNAi 技术检测 Pokemon 生物学功能	53
4.3 Pokemon 结合蛋白的寻找.....	53
4.4 展望	54
参 考 文 献	56
英文缩略词表	62
致谢	64

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 Pokemon	1
1.1.1 Discovery and biological characteristics of Pokemon	1
1.1.2 Pokemon subcellular localization and tissue distribution	2
1.1.3 Relationship between Pokemon and tumor	3
1.2 HCC	7
1.3 si RNA	9
1.4 GST fusion protein	10
1.5 Experiment design	10
Chapter 2 Materials and Methods	11
2.1 Suppressed Expression of Pokemon gene in HepG₂ Cells by RNAi	11
2.1.1 Materials	11
2.1.2 Methods	16
2.2 Purification of GST polypeptide fusion protein	27
2.2.1 Materials	27
2.2.2 Methods	29
Chapter 3 Experimental results and Conclusion	39
3.1 Suppressed Expression of Pokemon gene in HepG₂ Cells by RNAi	39
2.1.3 Experimental results	39
2.1.4 Conclusion	44
3.2 Purification of GST polypeptide fusion protein	45
2.2.3 Experimental results	45
2.2.4 Conclusion	51
Chapter 4 Discussion and expectation	52
4.1 Pokemon and HCC	52
4.2 Detection of Pokemon biological function by RNA interference	53

4.3 Getting protein interacted with Pokemon	53
4.4 Expectation	54
References	56
Abbreviation	62
Acknowledgement	64

第一章 前言

1.1 Pokemon

Pokemon基因（也称ZBTB7a基因）是目前已知的比较上游的原癌基因，它所编码的Pokemon（POK erythroid myeloid ontogenic factor,Pokemon）蛋白，既往被命名为FBI-1(factor binding to inducer of short transcripts (IST),FBI-1)、LRF（leukemia/lymphoma-related factor,LRF）或 OCZF（osteoclast derived zinc finger,OCZF）^[1-3]，是POK(POZ/BTB and Kruppel,POK)蛋白家族成员^[4]，在多种肿瘤中均高表达，例如淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和膀胱癌等。Pokemon是第一个被发现的可变阅读框基因（alternative reading frame,ARF）特异性转录抑制物^[5]，能和多种癌基因/抑癌基因产物相互作用，对于细胞分化和肿瘤产生起着重要作用。故Pokemon基因可作为基因治疗的一个有效靶点。

1.1.1 Pokemon 的发现与生物学特征

1.1.1.1 Pokemon 的发现

1997年Pessler 等^[1]从HeLa细胞的细胞核中抽提纯化出一种能特异地连接野生型1型免疫缺陷病毒短转录诱导物的细胞因子，并将其称之为FBI-1。1999年，Morrisson等^[6]发现FBI-1为一BTB/POZ(bric-a-brac tramtrack broad complex (BTB) or poxvirus and zinc finger (POZ)) 结构域蛋白。同年，Davies等^[2]也成功分离出一个新的POK蛋白-白血病/淋巴瘤相关因子LRF。1999年，krukita^[3]也报道了一种对于破骨细胞分化起关键作用的蛋白-破骨细胞锌指蛋白OCZF。Maeda^[4] 等于2005年1月在Nature上报道了Pokemon基因，认为它能够特异性地抑制抑癌基因ARF，促进肿瘤的发生发展。

1.1.1.2 Pokemon 的生物学特性

Pokemon 基因位于人类第 19 号染色体 1 区 3 带中的第三亚带（19p13.3），全长 21600bp，其 mRNA 长 4456bp，由两个外显子组成，含一个开放读码框，编码蛋白长 585 氨基酸残基（aa），分子结构包含 POZ 和 Kruppel 型锌指结构。

POZ 功能域是指痘病毒和锌指结构复合体，位于 Pokemon 第 34~101 位氨基酸处，长度为 68 个氨基酸，是具有蛋白-蛋白相互作用的高度保守区域，介导同源或异源二聚体形成^[7]，为蛋白招募联合抑制组蛋白脱乙酰酶（histone deacetylases, HDAC）复合物，也被称为 BTB 功能域，此结构域与 POK 家族的成员 BCL6, PLZF 非常类似，但静电特性差异很大^[9]。而 Stogios PJ^[9]等通过对规范二聚体模型观察发现，BTB 同型二聚体侧沟与 BCL6BTB 相同氨基末端相似性很低，来源于辅抑制物 SMRT 的 17 个残基的 BCL6BTB 结合结构域并不能与 Pokemon 的 BTB 结构与相结合；Kruppel 型锌指结构，位于 Pokemon 的羧基端，其碳末端具有 DNA 结合作用，并可通过补充 HDAC 和后续染色质重构起强力的转录抑制作用，具有 4 个 C₂H₂ 锌指结构域，分别位于第 382~404、410~432、438~460、466~490 位氨基酸处，长度为 23~25 个氨基酸^[10-12]。

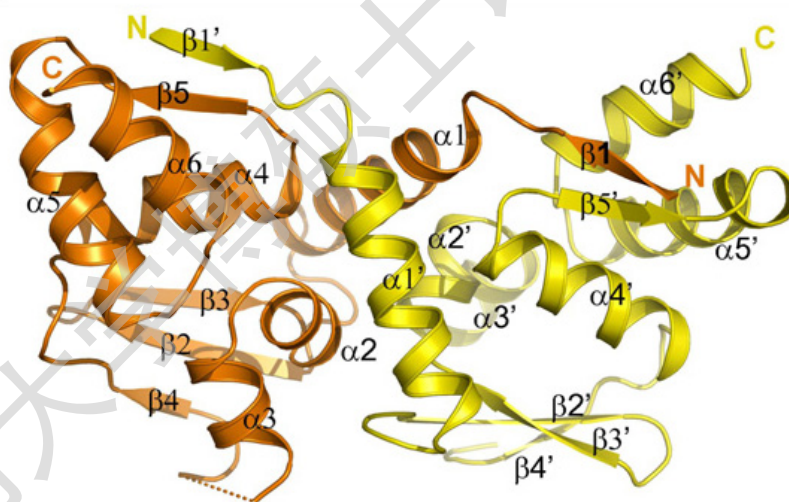


图 1-1 Pokemon POZ 域晶体结构

1.1.2 Pokemon 的亚细胞定位及组织分布

1.1.2.1 Pokemon 蛋白亚细胞定位

1999年, Morrison 等^[6]首次应用免疫荧光显微技术分析 Pokemon 的亚细胞定位,发现 Pokemon 位于细胞核。Dhordain PS^[13]研究表明, POK 蛋白通过 POZ 结构域形成同源和异源复合体,常表现点状核定位模式。Pendergrast 等^[14]也发现过表达的 Pokemon 定位于细胞核,而非溶性 Pokemon 则显示出了一个新的核周

点状定位模式，并可存在于其他胞核区域。另外，Lee等^[15]发现内源性过表达的Pokemon主要定位于HeLa细胞的细胞核，但也有少部分Pokemon定位于细胞质，并且发现无核定位信号序列Pokemon的POZ结构域可改变内源性Pokemon的亚细胞定位，并使其定位于细胞质。

1.1.2.2 Pokemon 组织分布

Pokemon在多种组织中都有表达，1999年，Morrison等^[6]通过Northern Blot分析发现Pokemon mRNA表达于人外周血白细胞、结肠、小肠和卵巢，通过Western Blot分析还发现在所被检测的人类细胞系（包括HeLa、Jurkat、BJAB和Raji细胞）都存在Pokemon蛋白的表达。同年，Davies等^[2]发现人和鼠Pokemon基因广泛表达于成熟组织和细胞系，并应用原位杂交方法分析了妊娠9.5~10d的鼠胚胎，发现肢芽、咽弓、尾芽、胎盘、神经管中都存在鼠Pokemon基因的广泛表达。此外，针对人类Pokemon基因的表达研究发现，Pokemon基因广泛表达于在不同组织和细胞系中，其中乳腺癌T47D细胞系及成人皮肤组织存在Pokemon过表达^[3]。2005年，Maeda等^[4]利用Pokemon单克隆抗体13E9组织芯片技术检测它在人类肿瘤中的表达，发现Pokemon在某些类型的人类乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和膀胱癌中过表达。近年来，通过免疫组化及RT-PCR分析，人们发现Pokemon在鼻咽癌、胃癌、肝癌中也都存在高水平表达^[15-17]。

1.1.3 Pokemon 与肿瘤发生的关系

1.1.3.1 Pokemon 在肿瘤生成中的作用

Maeda等^[4]研究发现，Pokemon失活的小鼠由于严重贫血和多种组织的细胞分化障碍而引起胚胎死亡，推断Pokemon基因可能对于肿瘤发生发挥重要作用。为了验证这一假设，Maeda等^[4]进行了一系列研究：首先利用早期小鼠胚胎成纤维细(mouse embryonic fibroblasts,MEFs)进行了经典的细胞生长和转化实验，发现缺失ZBTB7a基因的MEFs对其他原癌基因(如E1A、Ras、Myc和T-Ag等)介导的细胞转化完全无反应，而共同转染了Pokemon和其他原癌基因的MEFs表现出了明显的增殖活性并更易在琼脂糖平板上形成集落，同时利用Pokemon单克隆抗体13E9组织芯片技术检测它在人类肿瘤中的表达，发现Pokemon在人类乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和膀胱癌中有很高表达水平，这直接证明了Pokemon在

肿瘤发生过程中扮演着一个关键性角色。为进一步探索Pokemon在活体内的致癌作用，Maeda等^[4]利用转基因小鼠淋巴瘤模型，发现转染了Pokemon基因并高表达的小鼠均发生侵袭性淋巴瘤、胸腺增大伴淋巴结肿大、肝脾肿大和骨髓浸润。这些证据表明Pokemon在肿瘤的发生过程中发挥着重要作用。Rovin等^[18]的研究表明Pokemon在50%的短存活期的多形态性脑胶质瘤（GSM，glioblastoma multiforme）和15%的长存活期GSM肿瘤细胞内有高表达。Zhao Zhihong^[19]研究表明，Pokemon在非小细胞型肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）的癌变区域有明确表达，其与增值与肿瘤大小的相关性，它的表达对于NSCLC的预后评估可能具有重要的临床意义。这些试验提示Pokemon具有导致多种肿瘤发生的可能，也证实了其在肿瘤发生过程中的上游起始作用，可能是肿瘤发生的重要共同通路之一。

1.1.3.2 Pokemon 在肿瘤发生过程中的机制

Pokemon特异地抑制肿瘤抑制基因ARF的转录，它作为ARF的特异性抑制剂，通过Pokemon $\uparrow \rightarrow$ ARF $\downarrow \rightarrow$ MDM2 \rightarrow p53 $\downarrow \rightarrow$ 肿瘤发生的致癌模式而发挥作用。p19^{Arf}由INK4a-ARF位点编码，参与P53途径，P53在癌基因的刺激下均能诱导细胞凋亡，癌症中经常观察到它功能丧失^[21]。当Pokemon结合于p19^{Arf}启动子区时，可特异性的抑制p19^{Arf}的表达。p19^{Arf}可解除p53抑制因子Mdm2的抑制作用^[21]，导致p53激活；p19^{Arf}表达的减少将导致Mdm2抑制作用增加，p53表达下降，失去其功能，从而导致细胞分化、增生异常。

Chen等^[22]利用ARF荧光素酶探针和染色体免疫共沉淀作用分析(chromatin immoprecipitation assays)发现Pokemon在体内能直接结合p19^{Arf}，并抑制其活性。Maeda等^[4]运用荧光素酶标记处理ARF激动剂，观察标记物的活性，发现Pokemon通过剂量依赖模式有效地抑制了p19^{Arf}和p14^{Arf}，且这种抑制作用需要POZ/BTB域和锌指结构；研究还发现Pokemon能有效抑制转录调节物E2F1对ARF的激活和活化。在利用早期MEFs进行经典的细胞生长和转化实验中，对培养的ZBTB7a基因阴性成纤维细胞(MEFs)观察发现，培养开始时p19^{Arf}被正常诱导，中期p19^{Arf} mRNA及蛋白水平均上调，且发现P53的过表达。但p16^{Ink4a}未上调，而野生型MEFs在培养的不同阶段均发现p16^{Ink4a}逐渐增加。这些资料显示Pokemon对p19^{Arf}表达的重要性和选择性^[23-25]。ZBTB7a阴性的MEFs从培养中期开始出现p19^{Arf}上调，研

究衰老标记物发现, ZBTB7a阴性的MEFs在培养前期正常增殖, 而中期以后它们的增殖能力快速下降。通过加入Pokemon就能完全弥补这些细胞的生长缺陷, Pokemon过表达可以增强野生MEFs的增殖潜能。p19^{Arf}的失活也可使ZBTB7a阴性的MEFs更易被癌基因所转化。另外, Maeda等^[26]发现Pokemon是GATA1的一个直接靶点, 而且在终末红细胞分化中起抗凋亡作用。GATA-1依赖的转录对于红细胞的分化和成熟是必需的。Pokemon的缺失会导致胚胎的致命性贫血, 因为导致了晚幼期细胞的凋亡。这种程序性细胞死亡是不依赖于Arf and p53的, 但是被上调的凋亡因子Bim^[26]调节。Pokemon是Bim的直接抑制因子。作为这一机制的强力支撑, Bim的缺失将延迟LRF缺失导致的胚胎的死亡, 营救显性贫血。据此, Maeda等定义了一个有效红细胞形成的转录级联: GATA-1通过Pokemon进而抑制Bim介导的凋亡。

此外, 研究发现, POK家族成员的N末端POZ域可以通过形成一种巨大的联合抑制复合体介导它们的物理相互作用是Pokemon癌基因作用的机制之一。BTB/POZ域是一段存在细胞和病毒调节蛋白氨基末端的高度保守的蛋白-蛋白互相作用域, 它是许多转录因子、致癌基因蛋白、离子通道蛋白和一些机动蛋白相关蛋白的反应基序^[27, 28]。BTB/POZ域结构蛋白与许多关键的细胞过程比如细胞分化、肿瘤形成、细胞凋亡、离子通道活性和转录密切相关, 这些BTB /POZ结构域与其他BTB/POZ结构域形成同源或异源复合体发挥重要作用。Pokemon具有BTB/POZ域和Kruppel锌指结构, 暗示Pokemon也可通过蛋白-蛋白相互作用发挥类似作用, 可能存在多个靶基因, 并通过对靶基因的影响而发挥作用。

Sp1是哺乳动物中具有锌指结构的通用转录因子, 能够与目标基因上游调控序列的GC盒相结合, 启动基因转录。Jeon等^[29, 30]研究显示: Pokemon与Sp1转录因子在DNA片段上具有一定的相似性, 可能通过靠近并占据核心鸟嘌呤-胞嘧啶编码框, 干扰Sp1进入核心顺式元件, 阻断Sp1的正性调控作用, 靶基因不能起始转录, 表达下调(见图1-2)。目前已证实Pokemon通过这一机制可以抑制ARF、Rb、p21等基因的转录。Pokemon和位于Rb启动子(bp -308 to -188)的4个富含GC的启动子元件FREs结合。Rb启动子还有两个Sp1结合位点: GC-box 1 (bp -65 to -56) and GC-box 2 (bp -18 to -9), 后一个Pokemon也可以结合。FRE3 (bp -244 to -236)也是Sp1结合位点。FRE3 (bp -244 to -236)也是Sp1结合位点。Pokemon抑制Rb转录不

仅通过和FRE3结合，而且通过和Sp1竞争GC-box 2和the FRE3。通过结合到FREs and/or the GC-box，FBI-1通过它的POZ域抑制Rb基因转录，POZ域可以招募共抑制组蛋白脱乙酰酶复合物，使Rb基因启动子的组蛋白H3 and H4去乙酰化，强有力地抑制了Rb基因的转录。有研究^[31]认为Pokemon主要通过抑制p21抑癌基因的表达，诱发肿瘤发生。

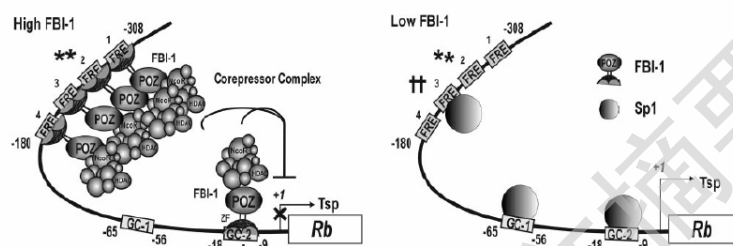


图 1-2 Pokemon 和 sp1 竞争结合调节 Rb 基因的转录机制假说

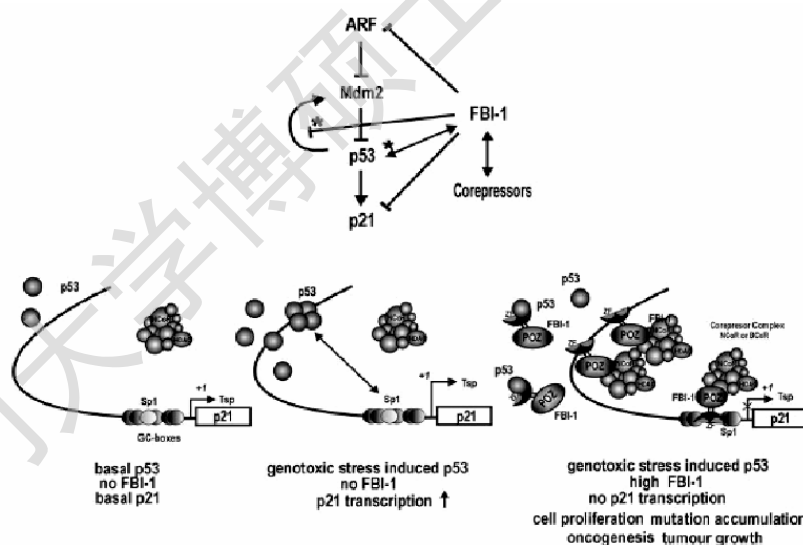


图1-3 Pokemon蛋白抑制p21表达的作用模式

近来研究还发现含BTB/POZ结构域蛋白与Cullin E3连接酶功能相关，POZ结构域蛋白家族作为Cullin3 E3泛素化连接酶复合体的接合体而发挥作用，因此，Pokemon可能又通过蛋白泛素化来调节其靶点和通路^[32]。通过对老鼠的研究发现

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库